

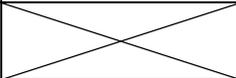
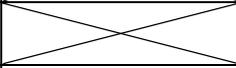
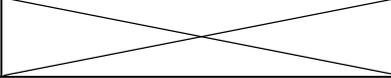
Kit transgénèse de la levure

Réfs. TRAN/SMAC et TRAN/SMC

Vérifier la composition du colis indiquée ci-dessous

- Lire les recommandations « **A LIRE IMPERATIVEMENT A RECEPTION** »
- Avant toute manipulation, étudier les conseils de **sécurité**

COMPOSITION

	1 souche Ade2 (boîte de pétri notée YT)	1L milieu sélectif 100ml milieu riche 50µl de plasmide 20ml de tampon lithium 5ml de tampon de transformation 30 ml d'eau stérile	50 boîtes de pétri stériles 40 microtubes à fond conique 5 cure-dents stériles 50 étaleurs stériles 4 poires stériles
TRAN/SMP		Milieus en poudre	
TRAN/SMAC		Milieus à couler (3 bouteilles de 340ml)	
TRAN/MAT			

MATERIEL NECESSAIRE

- Etuve
- Bec électrique ou poste de manipulation microbiologique (repiquage en conditions stériles)
- Bain-marie
- Ethanol ou eau de javel
- Gants, blouses
- **Micropipettes P1000, P100 et P10** et cônes (**voir la section « avant de commencer »**)

A LIRE IMPERATIVEMENT A RECEPTION

La souche de levures *Saccharomyces cerevisiae* Ade2 présente des colonies de couleur rouge. Cette couleur est due à un pigment.

Il est possible que le pigment se dégrade après 10-15 jours au réfrigérateur, on trouve alors des colonies blanches sur la boîte. Ces colonies ont parfois une taille plus importante que les autres colonies, **ce ne sont ni des mutants ni des contaminants !**

CONDITIONS NECESSAIRES AU ROUGISSEMENT DES LEVURES

- La température idéale de culture de cette souche est de 28°C.
- Le temps nécessaire au rougissement est de 4-5 jours, les colonies au départ ne sont pas pigmentées, elles rougissent seulement en fin de croissance.
- Le rougissement est un phénomène aérobiose, il ne faut pas parafilmer les boîtes en culture.

PRECAUTIONS

Nous vous conseillons de porter des gants lors de l'utilisation de ce kit.

Eviter l'inhalation et le contact avec la peau et les yeux pour l'ensemble des réactifs.

RAPPEL : TRAVAIL EN CONDITIONS STERILES

Lorsque l'on manipule des micro-organismes, il faut prendre des précautions qui sont de deux ordres : ne pas contaminer l'espèce étudiée avec des souches externes et ne pas polluer l'environnement avec nos expériences. Ainsi, il est fondamental de respecter certaines conditions expérimentales propres à l'espèce étudiée. Voici quelques règles concernant la manipulation des levures :

- Nettoyage de la paillasse à l'alcool ou à l'eau de javel
- Travail dans un rayon de 30 cm autour de la flamme d'un bec bunsen ou 15cm autour d'un bec électrique (ou lampe à alcool).
- Mains lavées, port d'une blouse en coton (**pas de gants près de la flamme**)
- Instruments et milieux stérilisés ouverts et utilisés autour de la flamme
- Ne mettre en contact que des matériels stérilisés entre eux et avec les cellules ; ne pas poser le matériel sur la paillasse ni toucher le col des tubes ou la partie du matériel qui sera en contact avec les levures, les milieux ou les solutions
- Pot avec javel pour récupérer les pipettes usagées
- Eviter les mouvements brusques et les courants d'air qui perturbent le périmètre stérile, ne pas parler devant des boîtes ouvertes
- Les levures sédimentent rapidement, il est donc nécessaire d'agiter les suspensions avant chaque prélèvement
- Noter au marqueur indélébile au dos des boîtes : initiales des binômes et dénomination de la boîte.

NB : une technique pratique permet de distribuer le matériel aux élèves tout en conservant sa stérilité : il suffit de stériliser une dizaine de serviette en papier (type essuie-main) enveloppées dans une feuille de papier aluminium = champ stérile. Fournir à chaque binôme un champ stérile, ainsi il suffit de glisser le matériel entre les deux premières serviettes (première épaisseur) et il reste stérile. De plus chaque binôme disposera de 10 serviettes donc au fur et à mesure de la manipulation, les élèves auront la possibilité de se servir de plusieurs épaisseurs pour poser leur matériel.

COMPOSITION ET CONSERVATION

- Souche : 4°C

Saccharomyces cerevisiae Ade2- sur boîte de pétri (notée YT)
La souche se conserve 3 semaines à 1 mois au réfrigérateur

- Milieu : Température ambiante

Version en poudre :

- 1 Sachet T1 pour reconstituer 100mL de milieu riche.

Ce sachet contient 3 sachets notés YP (extrait de levures et peptone), Glc (glucose) et Agar

- 1 Sachet YNBS pour reconstituer 1L de milieu sélectif.

Ce sachet contient 3 sachets notés YNB (bases aminées), Glc (glucose) et Agar .

- 1 tube de 10 ml suppléments nécessaires à la croissance de la souche (histidine, leucine, tryptophane et uracyle) noté SUP

Le milieu à couler se conserve 1 an à température ambiante

Version à couler :

- 1 bouteille de 100 ml de milieu riche (N°1)

- 3 bouteilles de 340 ml de milieu sélectif (N°2)

- 1 tube de 10 ml suppléments nécessaires à la croissance de la souche (histidine, leucine, tryptophane et uracile) noté SUP

Le milieu en poudre se conserve plusieurs années à température ambiante

- Réactifs :

- 50µL de plasmide (tube conique à bouchon rouge) **-20°C**
- 120µL d'ADN de sperme de saumon (tube conique à bouchon vert) **-20°C**
- 20ml de tampon lithium (Acétate de lithium 0,1M) noté LiAc **4°C**
- 30ml d'eau stérile (tube de 50ml à bouchon rouge) **4°C**
- 3370µL de PEG (polyéthylène glycol) tube 5 ml à bouchon rouge **4°C**
- 510µL de DTT (dithiothreitol) tube conique à bouchon blanc **4°C**
- 1120µL de LiAc (Acétate de lithium 1M) tube conique à bouchon violet **4°C**

Les réactifs se conservent 3 mois dans les conditions décrites ci-dessus

- Matériel (en option) :

- 50 Boîtes de pétri stériles
- 5 cure-dents stériles
- 50 étaleurs stériles
- 6 poires compte-gouttes stériles
- 20 tubes à fond coniques bouchon bleu
- 20 tubes à fond coniques bouchon jaune

OBJECTIFS COGNITIFS

Montrer que l'ADN est support de l'information génétique.

PRINCIPE

Après l'introduction d'un fragment d'ADN plasmidique porteur de l'allèle sauvage du gène Ade2 dans la souche Ade2⁻, celle-ci va pouvoir pousser sur milieu sans adénine et sa coloration sur milieu sans adénine va devenir blanche.

RAPPELS

MATERIEL BIOLOGIQUE

La levure *saccharomyces cerevisiae Ade2⁻* :

Il s'agit d'un champignon eucaryote unicellulaire haploïde. C'est le plus petit génome eucaryote connu : 14000 kb et 6200 gènes.

La souche utilisée porte une mutation qui affecte le gène **Ade2** impliqué dans la chaîne de biosynthèse de l'adénine (cf. schéma).

Le gène **Ade2** a pour fonction de transformer un intermédiaire de cette chaîne : l'Amino imidazole ribotide ou AIR qui se transforme en un pigment rouge en aérobiose.

La mutation **Ade2⁻** a deux effets :

- * La souche étant incapable de synthétiser l'adénine, elle ne poussera pas sur milieu minimum
- * Si on lui apporte l'adénine en supplémentant le milieu de culture (ou en la faisant pousser sur milieu riche), elle va l'utiliser et présentera un phénotype rouge du fait de l'accumulation de l'AIR.

Ce phénotype rouge nous permet de disposer d'un « crible positif » visible à l'œil nu ! On différencie ainsi facilement les souches qui portent la mutation **Ade2⁻** après croissance sur boîte de pétri.

NB : S'il y a trop d'adénine dans le milieu, un effet de rétro-inhibition (feed-back) peut avoir lieu sur les gènes en amont d'**Ade2**. Dans ce cas, les colonies resteront blanches ou à peine rosées.

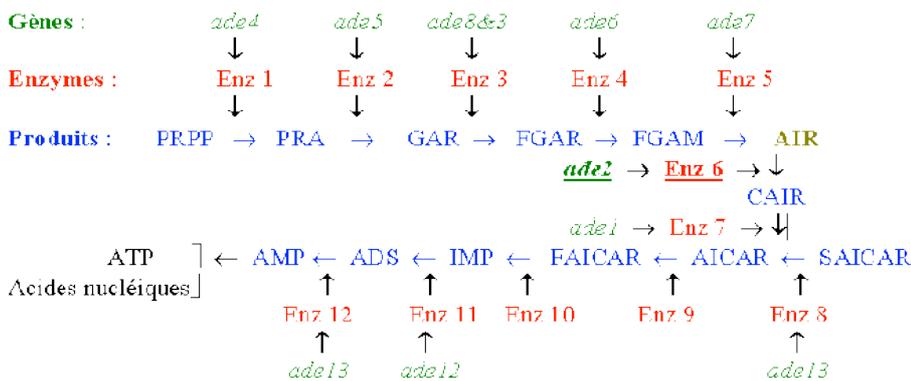
Quelques caractéristiques propres aux levures :

Les levures se reproduisent par bourgeonnement ou plus rarement par scissiparité (cloisonnement transversal) = spécificité des *Schizosaccharomyces pombe*.

Les levures forment des colonies coniques sur boîte de pétri, contrairement aux bactéries qui ont plutôt tendance à former des colonies plates et aux champignons dont le mycélium est facilement reconnaissable.

Leur taille (5 à 15µm) est supérieure à celle des bactéries (1 à 3 µm), ce qui permet de les observer facilement au grossissement 400.

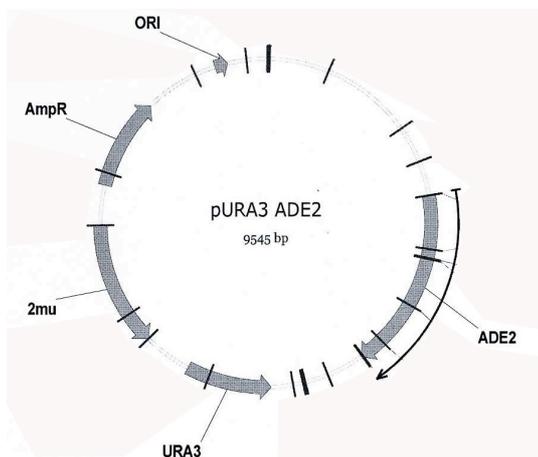
CHAÎNE DE BIOSYNTHESE DE L'ADENINE :



PRPP : phosphoribosyl pyrophosphate ; PRA : 5-phosphoribosylamine ;
 GAR : glycinamide ribotide ; FGAR : formyl glycinamide ribotide ;
 FGAM : formyl glycinamidine ribotide ; AIR : amino imidazole ribotide ;
 CAIR : 5-amino 4-carboximidazole ribotide ; SAICAR : 5-amino 4-succinocarboxy imidazole ribotide ;
 AICAR : 5-amino 4-carboxamide imidazole ribotide ;
 FAICAR : 5-amino 4-carboxamide imidazole ribotide ; IMP : inosine monophosphate.

PLASMIDE :

Le plasmide porte le gène fonctionnel Ade2.



PREPARATION

- **Une semaine avant la manipulation** : préparer les milieux de culture riche et sélectif (voir page suivante).

Conserver les boîtes de pétri au réfrigérateur couvercle vers le bas.

- **48h avant la manipulation** : effectuer un repiquage de la souche de levures Ade2 sur 2 boîtes de milieu riche : **Le but est de disposer de cultures fraîches**
 - o Réaliser un isolement en strie.
 - o Incuber les boîtes 48h à 28°C (Plus les boîtes sont vieilles moins la transformation est facile) Au-delà de 72H, il n'est plus possible de transformer.

PREPARATION DES MILIEUX

Milieu pré stérilisé à couler :

1) Faire chauffer les bouteilles de milieu au bain-marie bouillant (1cm au dessus du niveau du milieu) jusqu'à totale dissolution (30 à 60 minutes). Penser à dévisser légèrement le bouchon pour éviter l'explosion. Laisser légèrement refroidir, puis couler 16 à 17 boîtes par bouteille en conditions stériles. Soit faire fondre le milieu au micro-ondes, cependant éviter la puissance maximale et surveiller pour éviter les projections (baisser alors la puissance) ; contrôler également l'état du milieu toutes les 30 secondes (agiter par rotation) et penser à dévisser le bouchon.

2) Attendre le refroidissement complet du milieu, ajouter 3 gouttes du tube de supplément (utiliser une des poires compte-gouttes) étaler avec un étaleur stérile.

Conserver les boîtes au réfrigérateur couvercle vers le bas jusqu'au TP.

Milieu en poudre :

1) Ajouter le contenu des sachets YP, GLC et AGAR à 100mL d'eau déminéralisée, bien agiter.

Auto claver 15 minutes à 115°C puis couler 5 boîtes de pétri.

2) Ajouter le contenu des sachets YNB, GLC et AGAR à 1L d'eau déminéralisée, bien agiter et répartir par 500 ml.

Auto claver 15 minutes à 115°C puis couler 45 boîtes de pétri en conditions stériles.

Attendre le refroidissement complet du milieu, ajouter 3 gouttes du tube de supplément (utiliser une des poires compte-gouttes) étaler avec un étaleur stérile.

AVANT DE COMMENCER LE TP :

- **Passer l'ensemble des microtubes rapidement à la centrifugeuse afin de rassembler le liquide au fond des tubes.** Les volumes étant petits, le liquide tend à stagner contre les parois du tube.
- **Lors des pipetages, utiliser les micropipettes bien calibrées et de volumes appropriés :**
 - P1000 pour des volumes de 200µl à 1000µl
 - P100 (ou P200) pour des volumes de 20µl à 100µl (ou 200µl)
 - P10 pour des volumes de 1µl à 10µl

L'utilisation de micropipettes inadaptées entraîne des variations importantes des volumes pipetés et des consommations excessives de réactif inutilement.

MANIPULATION (Pour chaque binôme)

Dans les tubes à fond conique bouchon bleu répartir 1ml d'acétate de lithium.

A l'aide d'un cure-dents stérile, prélever un peu de culture d'Ade2 fraîche, la resuspendre dans l'acétate de lithium (tubes à fond conique bouchon bleu).

Incuber 10 minutes à 30°C.

Centrifuger 5 minutes à 3000 trs/min (ne pas centrifuger à une vitesse plus importante car les cellules traitées à l'acétate de lithium sont fragiles !)

Enlever **très délicatement** le surnageant pour ne pas perdre le culot.

Préparer le tampon de transformation : Au tube contenant les 3370µl de PEG ajouter les 510µl de DTT et les 1120µl de LiAc

Resuspendre **très délicatement** le culot avec 100µL de tampon de transformation (il va perméabiliser la membrane et permettre la pénétration du plasmide)

Nous vous conseillons de procéder par quelques **déliçats** mouvements de va et vient avec une micropipette.

Répartir par 50µL dans 2 microtubes à fond conique (bouchons bleu et jaune).

Ajouter 3µL d'ADN de sperme de saumon dans chacun des 2 tubes.

Attention à ne pas déposer la goutte sur la paroi du tube.

Ajouter 2µL de plasmide dans les tubes à bouchon bleu uniquement.

Attention à ne pas déposer la goutte sur la paroi du tube.

Mélanger par quelques **déliçats** mouvements de va et vient avec une micropipette.

Note : Le rôle de l'ADN de sperme de saumon est de limiter la dégradation de l'ADN plasmidique lors de la pénétration (la quantité d'ADN de sperme de saumon étant importante comparé à la quantité d'ADN plasmidique, la probabilité de dégradation de l'ADN plasmidique est beaucoup plus faible).

Faire un choc thermique : Incuber les 2 tubes 45 minutes au bain-marie à 42°C.

Centrifuger les 2 tubes 5 minutes à 3000 trs/min.

Éliminer les surnageants.

Resuspendre **déliçatement** les culots dans 100µL d'eau stérile.

Étaler le contenu de chacun des 2 tubes sur 2 boîtes de milieu sélectif.

Incuber 4 à 5 jours à 28°C.

Note : Théoriquement, il doit y avoir 3 boîtes de milieu riche en excès.

Ces boîtes peuvent servir de témoin : Effectuer un repiquage de la souche Ade2 sur milieu riche afin de montrer que la souche pousse en formant des colonies rouges.

MANIPULATIONS optionnelles (en spécialité)

1. A partir des deux tubes étalés ci-dessus, il est possible de **déterminer la fréquence de transformation** (nombre de cellules transformées/nombre de cellules totales). Pour cela, il suffit de faire un étalement après dilution de ces deux tubes sur milieu non sélectif. Les colonies seront rouges dans les deux cas :

Dans le tube sans plasmide, on retrouve le phénotype initial. Dans celui avec plasmide la fréquence de transformation étant faible, la grande majorité (plus de 99,99%) des levures sont sans plasmide.

2. Une autre manipulation possible est de **repiquer sur milieu non sélectif** les colonies blanches ayant poussé sur milieu sélectif : elles sont blanches contrairement au phénotype avant transformation (rouge sur ce milieu).

Pour ce faire, il suffit de commander du milieu YPD2.

RESULTATS ATTENDUS

Sur la boîte correspondant aux levures non exposées au plasmide, aucune colonie de pousse. Le milieu est dépourvu d'Adénine et la souche est incapable de le synthétiser.

Sur la boîte correspondant aux levures mises en présence du plasmide, on trouve des colonies blanches.

L'introduction du plasmide dans la levure Ade2 lui a rendu sa capacité à synthétiser de l'adénine. Les colonies sont blanches car le pigment rouge ne s'accumule plus car le gène Ade2 fonctionnel est porté par le plasmide.

CONSEILS DE SECURITE

NB : Placer tous les instruments dans l'eau de javel (concentration = 1%) en fin de manipulation.

Vous avez transformé des micro-organismes, aussi une fois que les résultats ont été observés, placer les boîtes dans de l'eau de javel (concentration = 1%) ou les autoclaver.

Ne pas toucher le milieu avec les mains et bien les laver en fin de séance (on ne contrôle jamais totalement ce que l'on fait pousser sur un milieu complet).